

TYRFOSTINY – DROBNOCZĄSTECZKOWE INHIBITORY KINAZ TYROZYNOWYCH

TYRPHOSTINS SMALL-MOLECULAR INHIBITORS
OF TYROSINE KINASES

Andrzej KLEIN i Joanna KISIELEWSKA

Zakład Biochemii Ogólnej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: Tyrozyno-swoiste kinazy białkowe, receptorowe (RTKs), jak i niereceptorowe (NTKs), pełnią centralną rolę w przenoszeniu sygnałów zewnątrzkomórkowych zarówno w komórkach prawidłowych, jak i neoplastycznych. Od lat poszukiwano inhibitorów uniemożliwiających przekaz sygnału przez kinazy tyrozynowe. Biorąc za wzór naturalne inhibitory kinaz białkowych (kwercetyna, erbstatyna itp.) Levitzki i wsp. zsyntetyzowali w latach 1988–1989 pierwsze syntetyczne inhibitory kinaz tyrozynowych i nadali im nazwę tyrfoستyny. Ponad 30 tyrfoستinów jest obecnie w fazie badań klinicznych. Struktura, aktywność biologiczna i aktywność przeciwnowotworowa wybranych inhibitorów kinaz receptorów EGF, IGF, VEGF oraz niereceptorowej kinazy BCR-ABL jest tematem niniejszego artykułu. Wydaje się, że największe szanse zastosowania w terapii przeciwnowotworowej mają tyrfoستyny podawane w mieszaninie z innymi inhibitorami transdukcji sygnału lub z cytostatykami.

Słowa kluczowe: inhibitory kinaz tyrozynowych, aktywność przeciwnowotworowa.

Summary: Receptor (RTK) and nonreceptor (NTK) protein tyrosine kinases play a central role in transduction of extracellular signals, both in normal and neoplastic cells. Therefore, several approaches to inhibit PTKs have been developed. According to the structure of natural protein kinase inhibitors (quercetin, erbstatin) Levitzki and coworkers prepared first synthetic tyrosine kinase inhibitors and coined the term „tyrphostins” (tyrosine phosphorylation inhibitors). Over 30 tyrphostins are now in various stages of clinical development. The structure, biological properties and antitumor activity of selected receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFRs, IGFRs, VEGFRs) and nonreceptor kinase BCR-ABL are discussed. The recent results indicate, that most effective therapy may be administration of the combination of PTK inhibitors with other signal transduction inhibitors or cytostatics.

Key words: tyrosine kinase inhibitors, antitumor activity.

Drobnocząsteczkowe inhibitory kinaz białkowych były od lat 80. XX wieku obiektem badań naukowych, także pod kątem ich przydatności w terapii przeciwnowotworowej. Jednak dopiero po roku 2001 zostały uznane jako związki, które obok klasycznych cytostatyków zostały dopuszczone, głównie w USA, jako leki przeciwnowotworowe. Nadzieje, jakie budzą każde nowe możliwości przeciwdziałania rozwojowi chorób hiperproliferacyjnych, uzasadniają wprowadzenie także i tych związków do terapii przeciwnowotworowej. Trudno dziś jednak jednoznacznie odpowiedzieć, czy ta nadzieja jest w pełni uzasadniona.

I. KINAZY TYROZYNOWE JAKO ATRAKCYJNY CEL TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

W przeciwieństwie do proteolizy, fosforylacja jest procesem odwracalnym i realizowanym wyłącznie wewnątrzkomórkowo (wymaga nakładu energii uzyskiwanej z hydrolizy ATP). Kinazy białkowe pośredniczą w regulacji większości dróg przenoszenia sygnału zewnątrzkomórkowego w komórkach eukariotycznych, a przez modyfikację swoich substratów kontrolują również wiele innych ważnych procesów komórkowych. Eukariotyczne kinazy białkowe są zwykle dzielone na 9 grup, 140 rodzin i 209 podrodzin [34]. Wśród nich jest 518 kinaz i 130 fosfataz białkowych. Ludzki „kinom” (zestaw genów człowieka kodujących kinazy białkowe) liczy 518 genów (i 106 pseudogenów), które kodują białka zaliczane do 187 podrodzin [34,35]. Najlepiej poznano dotąd enzymy zaliczane do kinaz serynowo/treoninowych i kinaz tyrozynowych, z których nieliczne mają podwójną swoistość. Mimo ogromnej ich różnorodności, wszystkie poznane kinazy eukariotyczne mają zbudowaną z około 270 aminokwasów domenę katalityczną o wysokim stopniu homologii [30]. Najbardziej konserwatywną część cząsteczki kinaz białkowych stanowi charakterystyczna sekwencja aminokwasów (pętla G), tzw. motyw Rossmanna -G-X-G-X-X-G-, odpowiedzialna za wiązanie ATP. Pierwsza z Gły motywu Rossmanna występuje w 94% wszystkich kinaz białkowych. Domena katalityczna ma także krótkie sekwencje aminokwasowe odróżniające kinazy serynowo/treoninowe od kinaz tyrozynowych.

Kinazy serynowo/treoninowe występują powszechnie we wszystkich komórkach eukariotycznych, a nawet w niektórych komórkach prokariotycznych (np. w *Streptomyces coelicolor*) [4].

Tyrozyno-swoiste kinazy białkowe (PTKs) to enzymy selektywnie fosforylujące tyrozynę w cząsteczkach białek. Ich obecność wykazano prawie wyłącznie w organizmach wielokomórkowych [6]. Enzymy te nie występują w drożdżach, grzybach i roślinach kwiatowych. Znalezione je natomiast w algach zielonych [50]. 99 genów koduje ludzkie kinazy tyrozynowe. Zazwyczaj dzieli się je na kinazy tyrozynowe: receptorowe (tab. 1) i niereceptorowe (ryc.1) [21, 23, 44,54]. Fosforylacja tyrozyny odgrywa istotną rolę w bardzo wielu procesach biologicznych, takich jak: regulacja wzrostu (także patologicznego), regulacja różnicowania, kontrola cyklu komórkowego,

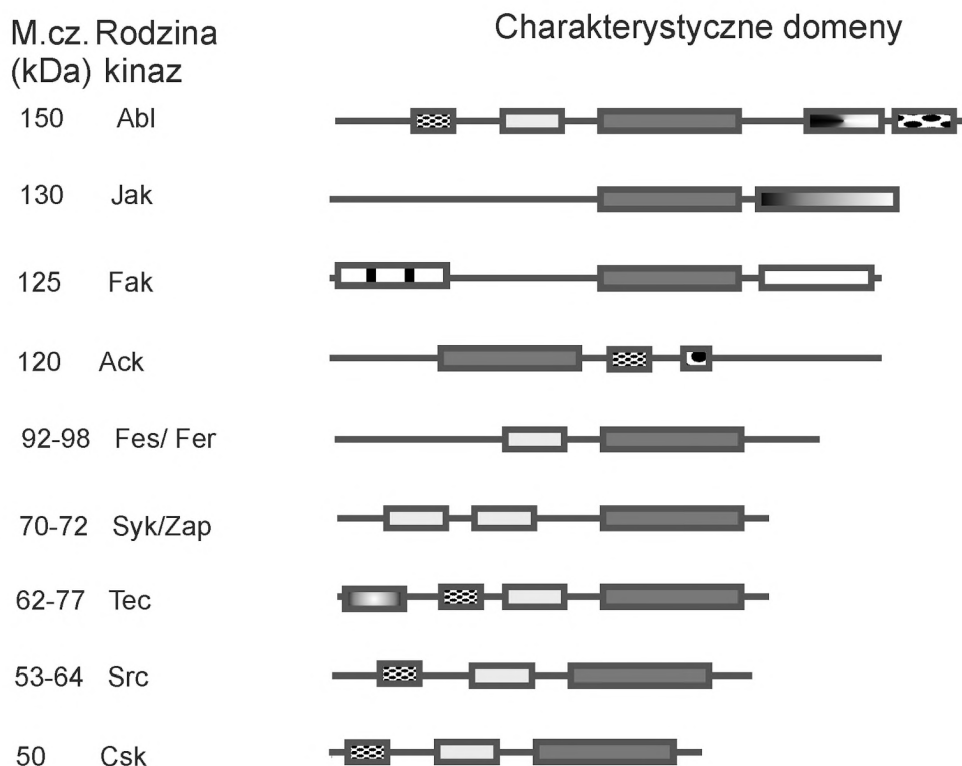
TABELA 1. Rodziny kinaz tyrozynowych receptorowych człowieka i ich ligandy

RODZINY KINAZ TYROZYNOWYCH RECEPTOROWYCH*	LIGANDY KINAZ TYROZYNOWYCH RECEPTOROWYCH
ALK (Alk, Lyk)	Receptor sierocy
AXL (Axl, Mer, Tyro3 [Sky])	Gas 6
DDR (DDR1, DDR2)	Kolageny
EGFR (ErbB1-ErbB4)	EGF, TGF α , AR, HB-EGF, BTC, ER, HRs
EPHR (EphA1–8 i 10, EphB1–4 i 6)	EphA (1–8), EphB (1–6)
FGFR (FGFR1-FGFR4)	FGF (1–23)
IR (IR, IGFIR)	Insulina, IGF (I–II)
LMR	Receptor sierocy
MET (Met, Ron)	HGF, MSP
MuSK	Agryna
NGFR (Trk A–Trk C)	NGF, BDGF, NT-3, NT-4/5
PDGFR (PDGFα, PDGFβ), CSF-1R, KIT, Flt3	PDGF (AA, AB, BB, CC, DD), CSF-1, SCF, FL
RET	GDNF, NRTN, PSPN, ARTN
ROR (Ror1, Ror2)	Receptor sierocy
ROS	Receptor sierocy
RYK (Ryk, Rykps)	Receptor sierocy
TIE (Tie, Tek)	Ang (1–4)
TKU	Receptor sierocy
VEGFR (VEGFR1–VEGFR3)	VEGF (A–E), PlGF

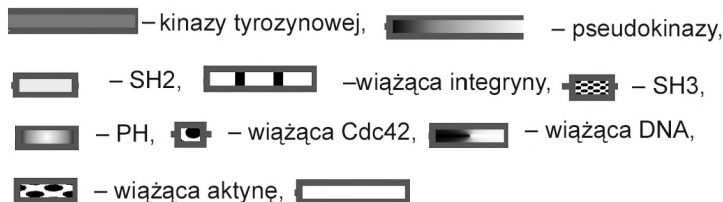
* – pogrubioną czcionką zaznaczono receptory czynników wzrostowych

ALK – anaplastic lymphoma kinase, Ang – angiopoietin, AR – amphiregulin, ARTN – artemin, AXL – (*greek*) anexelekto, BGF – brain-derived growth factor, BTC – betacellulin, CSF – colony stimulating factor, DD – discoidin domain, EGF – epidermal growth factor, EPH (Eph) – ephrin, ER – epiregulin, ErbB – erythroblastoma B, FGF – fibroblast growth factor, FL – Flt3 ligand, Flt – fetal liver tyrosine kinase, Gas6 – growth arrest specific gene 6, GDNF – glial cell derived neurotrophic factor, HARP – heparin affin regulatory peptide, HGF – hepatocyte growth factor, HR – heuregulin, I – insulin, IGF – insulin-like growth factor, LMR – lemur, Ltk – leukocyte tyrosine kinase, MET – protoonkogen c-Met, MSP – macrophage stimulating protein, MuSK – muscle skeletal, NGF – nerve growth factor, NRTN – neurturin, NT – neurotrophin, PDGF – platelet-derived growth factor, PlGF – placenta growth factor, PSPN – persephin, PTN – pleiotrophin, R – receptor, RET – rearranged during transfection, Ryk – related to tyrosine kinase, SCF – stem cell factor, TIE – tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domain, Trk – tyrosine kinase, TKU – tyrosine kinase unique, EGF – vascular endothelial growth factor

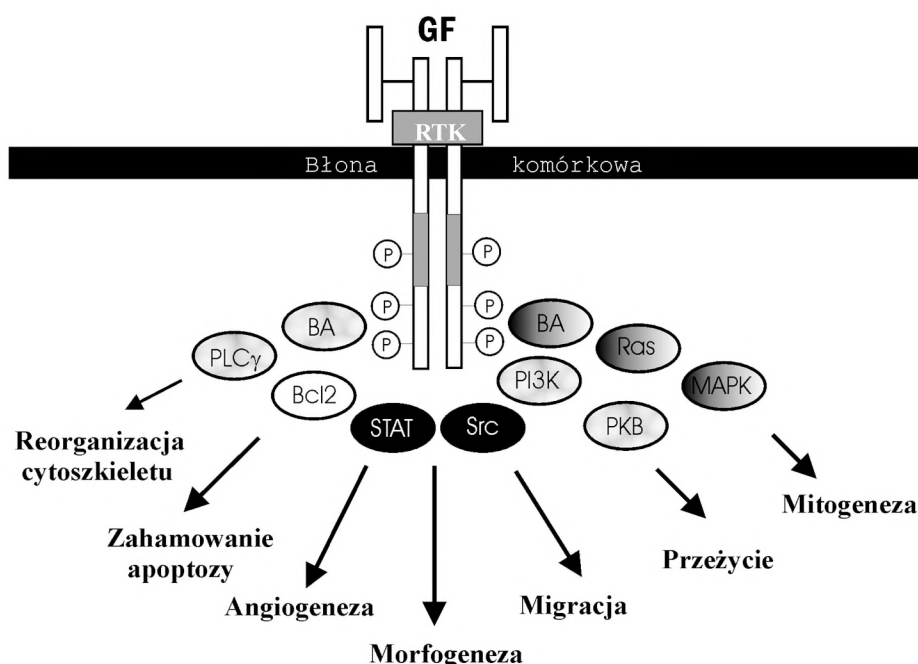
regulacja kształtu komórek i adhezji komórkowej, sygnalizacja transbłonowa i wewnątrzkomórkowa, kontrola wielu szlaków metabolicznych, regulacja transkrypcji, regulacja działania kanałów jonowych oraz receptorów niektórych neurotransmiterów. Przyczyną tej wielostronnej aktywności jest pleiotropowy sygnał inicjowany aktywacją receptorowych kinaz tyrozynowych (RTKs) (ryc. 2) oraz udział kinaz tyrozynowych niereceptorowych (NTKs) w wielu szlakach sygnałowych.



RYCINA 1. Domenowa struktura kinaz tyrozynowych niereceptorowych. Domeny:

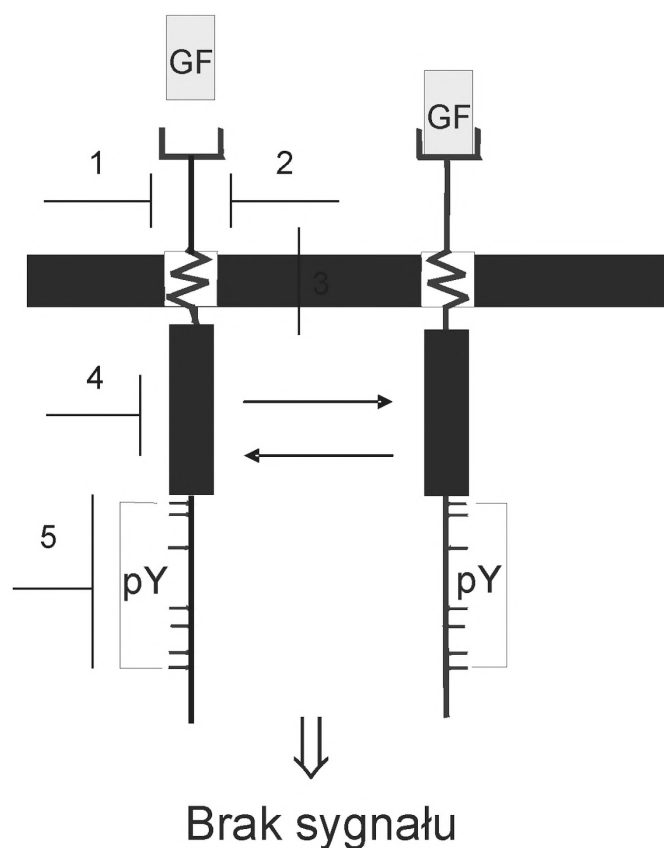


Przekaz sygnału przez receptorowe kinazy tyrozynowe przebiega w kilku etapach obejmujących: wiązanie liganda, dimeryzację receptorów, autofosforylację, wiązanie białek adaptorowych oraz inicjację kaskad sygnałowych (wieloenzymatycznych). Precyzyjna regulacja aktywności RTKs jest warunkiem prawidłowego funkcjonowania wszystkich komórek organizmu. Niestety w wielu chorobach stwierdzono zaburzenia w przekazie sygnału realizowanego za pośrednictwem RTKs. Jednym z najbardziej niebezpiecznych jest onkogenna aktywacja tych kinaz, która może być wynikiem zmian zarówno w ich strukturze, jak i w ich ilości [32,42,44]. Zmiany spowodowane mutacją, delecją lub translokacją genów kinaz tyrozynowych mogą skutkować konstytutywną aktywacją tych enzymów. Natomiast, zwiększenie poziomu RTKs i ich ligandów prowadzi do powstania tzw. autokrynej pętli wzrostowej. W obu przypadkach skutkiem



RYCINA 2. Plejotropowy sygnał inicjowany aktywacją kinaz tyrozynowych receptorowych: BA – białko adaptorowe, Bcl-2 – białko antyapoptotyczne, GF – czynnik wzrostowy, MAPK – kaskada kinaz MAP, PI3K – 3-kinaza fosfatydoinozytoli, PKB – kinaza białkowa B (Akt), PLCγ – fosfolipaza Cy, RTK – kinaza tyrozynowa receptorowa, Src – kinaza z rodziny Src, STAT – cytoplazmatyczne czynniki transkrypcyjne pośredniczące w działaniu cytokin i czynników wzrostowych

jest niekontrolowany wzrost komórkowy. Nic więc dziwnego, że zahamowanie sygnału przekazywanego przez kinazy tyrozynowe jest celem wielu prac badawczych [7,10,25,41,59]. W przypadku RTKs na każdym z wymienionych etapów sygnalizacji transbłonowej można zahamować przekaz sygnału i dla wszystkich poszukiwano bardziej lub mniej swoistych inhibitorów [3] (ryc. 3). W pierwszym etapie wykorzystano między innymi monoklonaalne przeciwciała, z których najbardziej znane są: Herceptyna – przeciwciało anti-HER2, Erbitux – przeciwciało dla EGFR, bevacizumab – przeciwciało dla VEGFR2 czy CDP 860 – przeciwciało dla PDGFR [3,24,27]. Także etap dimeryzacji receptorów był przedmiotem zainteresowania wielu grup badawczych. Chociaż indukowana ligandem dimeryzacja RTKs wymaga prawdopodobnie udziału różnych domen receptora, to istotne znaczenie w tym procesie ma domena transbłonowa i jej okolice. Zsyntetyzowano wiele krótkich peptydów 12–30 reszt aminokwasowych, wiążących się z tymi fragmentami receptora, efektywnie blokujących dimeryzację receptorów [9,47]. Podobnie efektywne okazały się małe peptydy blokujące domeny białek adaptorowych, wiążących się z fosfotyrozynami receptora lub blokujących wiązanie białek adaptorowych do kolejnych uczestników szlaku mitogenego. W przypadku Grb2 użyto bogatych w prolinę „peptidimerów” (mających dwie identyczne sekwencje prolinowe) do zablokowania jego dwóch domen SH3 [5,15], przerywania sygnału Grb2 → GEF



RYCINA 3. Możliwości zahamowania aktywacji i przekazu sygnału przez kinazy tyrozynowe receptorowe: 1 – antagoniści liganda, 2 – przeciwciała monoklonalne dla RTK, 3 – inhibitory dimeryzacji, 4 – inhibitory kinazy tyrozynowej (tyrfostry), 5 – związki blokujące oddziaływania receptor - wewnątrzkomórkowe białka sygnałowe

i uniemożliwienia aktywacji kaskady MAP. Ale, najbardziej, zaawansowane są obecnie prace nad drobnocząsteczkowymi inhibitorami kinaz tyrozynowych, nazwanych tyrfostry (tyrphostin, ang. *tyrosine phosphorylation inhibitor*).

II. TYRFOSTRY

Historia tyrfostry rozpoczęła się w początku lat 80. Pierwszym krokiem w badaniach drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz tyrozynowych było odkrycie, że naturalne związki, takie jak: kwercetyna, erbstatyna, genisteina hamują aktywność wybranych kinaz tyrozynowych zarówno receptorowych, jak i niereceptorowych. Mimo małej selektywności tych inhibitorów, posłużyły one jako pierwowzór syntetycznych inhibitorów kinaz tyrozynowych (PTKs). W latach 1988–1989 Levitzki i wsp. rozpoczęli

TABELA 2. Wybrane tyrfostry i swoistość ich działania

Kinaza docelowa	Tyrfostry	Wiązanie innych kinaz	Producent
Receptorowa			
EGFR (ErbB1)	ZD1839; [O], (ATP) OSI-774 [O], (ATP) CI-1033; [N], (ATP) PKI-166; [O], (ATP)	ErbB2 ErbB2 ErbB2-ErbB4 ErbB2	AstraZeneca Tarceva Pfizer Novartis
PDGFR	SU11248; [O], (ATP)	VEGFR (1-3), FLT-3, Kit	Pfizer
IGFIR	PPP; [O], (S) NVP-ADW742; [O], (ATP)	IR	
FGFR	SU6668; [O], (ATP)	PDGFR	SUGEN/Pharmacia
TRK	CEP-701; [O], (ATP)	FLT-3	Cephalon
VEGFR2	SU5416; [O], (ATP) ZD6474; [O], (ATP) BAY 43-9006; [O], (ATP)	VEGFR (1 i 3), FLT-3 VEGFR (1 i 3), EGFR VEGFR3, PDGFR, Kit, FLT-3, p38	SUGEN/Pharmacia AstraZeneca Bayer/Onyx
Niereceptorowa			
SRC	PPI; [O], (ATP) PD116285; [O], (ATP)	Kit, BCR-ABL	
ABL	STI-571; [O], (ATP) AMN107; [O], (ATP) BMS-354825; [O], (B)	Kit, PDGFR Kit, PDGFR, SRC	Novartis Novartis Bristol-Myers Squibb

[O] – wiązany odwracalnie, [N] – wiązany nieodwracalnie, (ATP) – konkurujący o wiązanie z ATP, (S) – konkurujący o wiązanie z substratem, (B) – bisubstratowy

od syntezy hydroksyfenoli naśladujących swoją budowę tyrozynę. Najpierw była rodzina „malononitryli”, których strukturę opracowano wykorzystując obserwowaną aktywność biologiczną kwasu itakonowego i erbstatyny, a jednym z pierwszych takich związków był tyrfostry AG99 [28]. Wiele z tych związków hamowało wydajnie aktywność PTKs i co ważne wykazywało niewielką toksyczność *in vitro* i *in vivo*. Wyniki te skłoniły szefa f-my Novartis, Daniela Vasellę do poszukiwań efektywnego inhibitora kinazy BCR-ABL, charakterystycznej dla wczesnej fazy (3–5 lat) chronicznej białaczki szpikowej (CML). To białko fuzyjne jest niezbędne dla przeżycia komórek CML i wydawało się prawdopodobne, że zahamowanie aktywności tej kinazy może prowadzić do eliminacji tych komórek w drodze apoptozy. Pierwsze, selektywne drobnocząsteczkowe inhibitory PTKs opisano w roku 1992. Spośród wielu na uwagę zasługuje tyrfostry AG957 współzawodniczący z substratem inhibitor, działający proapoptotycznie,

którego analog, adafostin był testowany klinicznie [29,40]. Ale prawdziwą karierę zrobiły inhibitory konkurujące z ATP o wiązanie z enzymem (inhibitory współzawodniczące z ATP), między innymi: tyrfostiny AG1112 i AG1318. Dzisiaj superrodzina tyrfostinów liczy kilkaset związków i jest zazwyczaj dzielona na cztery grupy inhibitorów: a) współzawodniczące z substratem, a niewspółzawodniczące z ATP, b) konkurujące z ATP, c) o mieszanej kompetycji, d) bisubstratowe.

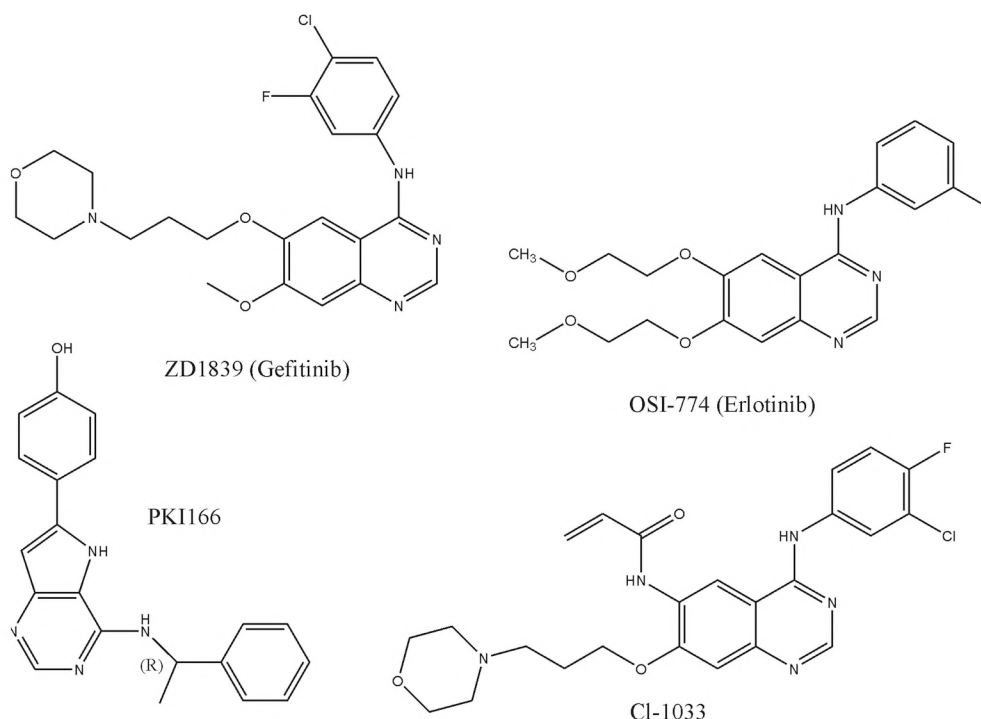
Dotychczas, zastosowanie kliniczne znalazły głównie tyrfostiny konkurujące z ATP lub te o mieszanej kompetycji. Wytlumaczeniem jest fakt, że znacznie łatwiej jest zsyntetyzować związki dopasowane do strukturalnie zwartej domeny wiążącej ATP niż do bardziej otwartej domeny wiążącej substrat. Najbardziej popularnymi inhibitorami grupy inhibitorów ATP-podobnych są: anilinochinazoliny, anilinochinoliny i anilinopirydopirymidyny [28]. Wydawało się, że trudno będzie uzyskać odpowiednią selektywność działania tej grupy inhibitorów, ze względu na konserwatywną strukturę domeny wiążącej ATP, ale okazało się, że drobne różnice, głównie w regionach flankujących domenę, pozwoliły na syntezę w miarę selektywnych inhibitorów PTKs, chociaż nie wszystkie z nich są całkowicie specyficzne.

Mimo że inhibitory współzawodniczące z ATP są bardziej popularne niż współzawodniczące z substratem, to nadal trwają poszukiwania specyficznych tyrfostinów hamujących wiązanie substratu. Po pierwsze domena wiążąca substrat jest mniej konserwatywna niż wiążąca ATP, a po drugie związki chemiczne naśladujące substrat nie muszą współzawodniczyć z wysokim, wewnątrzkomórkowym poziomem ATP. To ostatnie stwierdzenie jest istotne, ponieważ wpływa bezpośrednio na dawki tyrfostinów stosowanych *in vivo*, a co za tym idzie, obniżają toksyczność leków stosowanych w terapii. Selektywność wybranych tyrfostinów przedstawiono w tabeli 2. Przyjmuje się, że selektywne są te związki, których aktywność jest o co najmniej jeden lub dwa rzędy wielkości większa dla kinazy docelowej niż dla innych kinaz białkowych. Za bisubstratowe uważa się tyrfostiny hamujące aktywność co najmniej dwóch kinaz, przy stężeniu tego samego rzędu.

Chociaż rocznie syntetyzowane są dziesiątki nowych tyrfostinów, tylko niektóre z nich docierają do trzeciej fazy badań klinicznych. Przyczyny są różne, ale przede wszystkim są nimi efekty wtórne długotrwałego podawania tych związków. Dotychczas, największe nadzieje budzą tyrfostiny hamujące aktywność receptorów EGF, VEGF i IGF oraz inhibitory fuzyjnej kinazy BCR-ABL.

Inhibitory EGFR

Nadekspresja receptorów należących do rodziny ErbB była stwierdzona w bardzo wielu chorobach nowotworowych, między innymi w nowotworach: przewodu pokarmowego, prostaty, piersi, pęcherza, nerek, trzustki, jajników i płuc [2,19]. W przypadku niektórych typów nowotworu piersi liczba receptorów EGFR osiągała poziom 10^6 /komórkę (około 100-krotnie większy od prawidłowego). Z drugiej strony także liczne delecje i mutacje tych receptorów opisano w niektórych typach nowotworów. Szczególnie niebezpieczne są te, które skutkują ciągłą aktywacją EGFR, jak np. delecja 6-276 reszty aminokwasowej w części zewnątrzkomórkowej (EGFRvIII). Liczba tego typu „uszkodzonych” receptorów na ogół nie ulega obniżeniu w procesie endocytozy,



RYCINA 4. Wybrane tyrfostryny swoiste dla kinazy EGFR

a liczne przypadki ich obecności zostały stwierdzone w glejakiach oraz w nowotworach: piersi i prostaty. Dlatego, poszukiwania łatwo przyswajalnych, nietoksycznych inhibitorów kinaz receptorów EGF są prowadzone na szeroką skalę.

W trakcie ostatnich 10 lat ponad 20 inhibitorów EGFR było testowanych na różnych szczeblach badań podstawowych i klinicznych. Pierwszymi tego typu inhibitorami były: związki o budowie anilinochinazolin: ZD1839 (Gefitinib) i OSI-774 (Erlotinib), a później CI-1033 i pochodna pirolopirymidyny PKI166 (ryc. 4) [1,22,45,56]. Wszystkie te tyrfostryny współzawodniczą z ATP. Gefitinib i Erlotinib mają podobną strukturę i aktywność biologiczną. Są stosunkowo selektywne, np. Gefitinib wiąże się z EGFR (HER1) z powinowactwem około 100-krotnie większym niż z HER2. Gefitinib testowany był od roku 2002 w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuc, ale okazało się (podobnie jak w przypadku Erlotinibu), że jest skuteczny dla małego odsetka pacjentów [42,51] z mutacją w domenie kinazowej, której konsekwencją jest konstytutywna stymulacja aktywności EGFR. We wszystkich innych przypadkach inhibitory te zawodziły. I trudno było rozstrzygnąć, czy aktywność EGFR jest nieistotna dla przeżycia komórek nowotworowych czy brak efektu działania inhibitora wynika ze zbyt krótkiego czasu trwania kompleksu enzym-inhibitor. Niepowodzenia te spowodowały, że obecnie żadne nowe odwracalne inhibitory EGFR nie są badane klinicznie.

Główne wady odwracalnych, ATP-kompetytywnych inhibitorów PTKs to konieczność stosowania dużych dawek tych związków (wynikająca z wysokiego stężenia

komórkowego ATP) oraz ich krótki czas półtrwania w krążeniu [26,28]. Dlatego zsyntetyzowano serię tyrfostinów wiążących się nieodwracalnie z RTKs (PD168393, CI-1033, HKI272, EKB-569), z których trzy: CI-1033, HKI272 i EKB-569 są obecnie testowane klinicznie [Levitzki 2006].

Najlepsze wyniki uzyskano stosując tyrfostiny w kombinacji z innymi czynnikami. Mogą to być połączenia tyrfostinów z przeciwciałami skierowanymi przeciw tej samej kinazie, np. tyrfostin RG 13022 i przeciwciało (anty-EGFR) mAb108 przeciw rakowi płaskokomórkowemu lub Gefitinibu i przeciwciało (anty-EGFR) mAb 225 w hamowaniu guzów generowanych komórkami A431 u bezwłosych myszy [28,36].

Inhibitory IGFIR

Insulino-podobne czynniki wzrostowe (IGFs) stymulują wzrost i przeżywalność komórek prawidłowych i nowotworowych, a zaburzenia w ich funkcji wskazują na udział tych związków w powstawaniu nowotworu [38]. Chociaż tylko jeden z receptorów IGFs ma aktywność kinazy tyrozynowej, oba ligandy mogą (aczkolwiek z różnym powinowactwem) z nim oddziaływać [23]. Dlatego prace nad syntezą inhibitorów kinazy IGFIR mimo obiektywnych trudności trwają nadal.

Poszukiwanie swoistych inhibitorów dla kinazy receptora insulino-podobnego czynnika wzrostowego typu I (IGFIR) jest szczególnie trudne, ponieważ domena kinazowa tego białka jest bardzo podobna (84% homologii sekwencji aminokwasowej) do domeny kinazowej receptora insuliny (IR), a w obrębie subdomeny wiążącej ATP podobieństwo to wynosi 100% [17]. To stwarza niebezpieczeństwo oddziaływania inhibitora IGFIR z receptorem insuliny i modyfikację metabolizmu węglowodanów i lipidów. W ostatnich latach zsyntetyzowano kilka tego typu związków, z których dwa NVP-ADW742 i PPP zasługują na uwagę. Pierwszy z nich hamuje aktywność kinazy IGFIR około 16 razy silniej niż IR. W dawkach NVP-ADW742 efektywnie hamujących aktywność IGFIR nie obserwowano wpływu na efekty metaboliczne (utlenianie glukozy, poziom insuliny, masę ciała) zwierząt doświadczalnych [16]. NVP-ADW742 okazał się wydajnym inhibitorem szpiczaka mnogiego (*in vitro* i *in vivo*), bez widocznych efektów toksycznych. Hamował także wspólnie z imatinibem lub z etopozydem wzrost wybranych linii nowotworowych komórek płuc [58]. Inny wysoko selektywny inhibitor IGFIR jest cyklolignanem, pochodną pikropodofiliny (PPP). Badania kinetyczne wskazują, że ten tyrfostin nie wiąże się z domeną ATP i sugerują inny nieokreślony dotychczas mechanizm jego działania [52]. Hamuje fosforylację IGFIR (i nie oddziałuje z IR) i Akt, stymulując proces apoptozy [18].

Inhibitory BCR-ABL

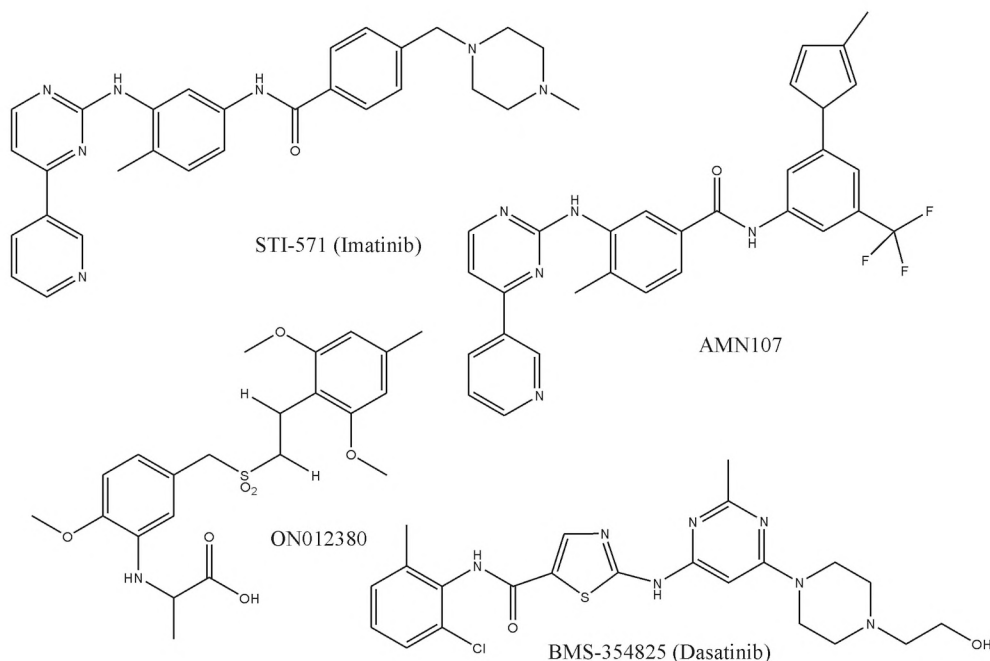
Chromosom Philadelphia (Ph) został po raz pierwszy opisany przez Nowella i Hungerforda w roku 1960. W 1973 Rowley wykazał, że ten nieprawidłowy chromosom występuje u 95% pacjentów z chroniczną białaczką szpikową (CML) oraz u 25–40% dorosłych i 5–10% dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL). Znanych jest dzisiaj kilka białek fuzyjnych BCR-ABL (p180, p185-190, p203, p210, p230). Największą aktywność mają p185-190^{bc_r-abl} i p210^{bc_r-abl}, a to ostatnie białko występuje najczęściej w

ludzkich przewlekłych białaczkach szpikowych [31,33]. p210^{bcr-abl} jest konstytutywnie aktywną kinazą tyrozynową, różniącą się od c-ABL także lokalizacją komórkową, fosforylacją substratów nierozpoznawanych przez prawidłową kinazę, hamowaniem procesu apoptozy i zdolnością do naprawy uszkodzeń DNA wywołanych cytostatykami lub promieniowaniem jonizującym [31]. We wczesnej fazie (3–5 lat) przewlekłej białaczki mieloblastycznej (szpikowej) (CML), komórki wymagają do przeżycia aktywnej kinazy BCR-ABL, co sugerowało, że zahamowanie tej kinazy może eliminować komórki nowotworowe. Pierwsze silne inhibitory BCR-ABL (AG597, adafostyna, AG1112, AG1318) opisano w 1992 roku.

W roku 1996 zespół naukowców firmy Novartis zsyntetyzował nowy inhibitor, tyrfostin STI-571, znany dzisiaj pod nazwami Imatinib, Gleevec lub Glivec [12]. Okazało się, że jest dobrze tolerowany przez pacjentów i ma niewielkie efekty uboczne. Łączy się z nieaktywną kinazą BCR-ABL i blokuje jej domenę wiążącą ATP. Hamuje nie tylko aktywność BCR-ABL, ale także kinaz PDGFR i c-Kit. Ta ostatnia informacja była niepokojąca, bowiem kinazy te odgrywają istotną rolę w przeżyciu komórek prawidłowych. Na szczęście większość komórek prawidłowych potrafi wykorzystywać alternatywne drogi sygnałowe i nawet w 90% zahamowanie aktywności wymienionych kinaz nie jest dla nich śmiertelne. W przeciwieństwie do komórek białaczkowych, których przeżycie jest całkowicie zależne od aktywnej kinazy BCR-ABL [28].

Niestety nie wszystkie przypadki przewlekłej białaczki szpikowej okazały się wrażliwe na STI-571. Oporność na leczenie tym tyrfostinem wynikała z różnych przyczyn. Najczęstszą były mutacje w obrębie domeny wiążącej ATP [48,57], np. zastąpienie Thr 315 przez Ile. Inne to: amplifikacja genu Bcr-Abl i rzadko spotykane, uruchomienie alternatywnej drogi przekazu sygnału. Te obserwacje były przyczyną podjęcia poszukiwań nowych inhibitorów ATP-kompetytywnych oraz użycie mieszanin inhibitorów o różnym współzawodnictwie. Przykładem tych pierwszych są: tyrfostiny AMN107 i BMS-354825 (były aktywne we wszystkich badanych przypadkach poza mutacją T315I), a drugich zastosowanie mieszaniny (1:1) inhibitorów wiążących się z domeną ATP (STI-571) i z domeną substratową (ON012380). Taka mieszanina była aktywna *in vitro* już w stężeniach subnanomolowych ($IC_{50} = 0,1$ nM). Budowę najbardziej skutecznych inhibitorów kinazy EGFR przedstawiono na rycinie 5.

Nowym polem zastosowań STI571 okazały się nowotwory przewodu pokarmowego objęte wspólną nazwą GIST (ang. *gastrointestinal stromal tumor*). GIST występują najczęściej w żołądku (65%) i jelicie małym (25%), a rzadziej w okrężnicy, odbycie i w przełyku [13]. Nawet po całkowitej resekcji guzów następują nawroty, a 50% pacjentów przeżywa około 5 lat. Typowym, pierwotnym miejscem przerzutu są: wątroba, otrzewna lub oba narządy. Ponadto, GIST są odporne na konwencjonalną chemioterapię, a liczba pacjentów odpowiadających na te leki nie przekracza 5%. Odkrycie STI571 zrewolucjonizowało leczenie metastatycznych lub nieoperowalnych GIST. Stosowano maksymalne dawki 400 mg dwa razy dziennie i obserwowano stosunkowo niewielkie efekty uboczne. W ponad 60% przypadków guzy ulegały częściowej regresji. Niestety, pierwsze sukcesy zostały przyćmione obserwacją, że dłuższe stosowanie STI571 nie jest obojętne dla organizmu. Stwierdzono pojawianie się nowych mutacji i amplifikacji genów [14].



RYCINA 5. Wydajne inhibitory kinazy BCR-ABL

AMN107 jest przedstawicielem drugiej generacji inhibitorów ABL, wprowadzonych przez firmę Novartis Pharmaceuticals [33]. Jest to pochodna anilinopirymidyny podobna strukturalnie do STI571 i podobnie jak imatinib wiąże się z kinazą w formie nieaktywnej. AMN107 okazał się 10–25-krotnie bardziej aktywny w hamowaniu autofosforylacji receptora i proliferacji oraz w stymulacji apoptozy transformowanych ludzkich linii komórek hematopoetycznych. Hamuje wydajnie autofosforylację Tyr177, uczestniczącą w wiązaniu białka adaptorowego Grb2 i dalszy przekaz sygnału.

Pirydyno[2,3-d]pirymidyna (BMS-354825, dasatinib) jest nowym inhibitorem ABL wprowadzonym przez firmę Bristol-Meyers Squibb (USA), który hamuje także aktywność kinaz z rodziny Src [33,39]. W przeciwieństwie do STI571 i AMN107, BMS-354825 wiąże się zarówno z nieaktywną, jak i aktywną postacią BCR-ABL. Wykazano, że BMS-354825 (dasatinib) jest nawet 100-krotnie (zależnie od testowanej linii komórkowej) silniejszym inhibitorem kinazy ABL niż imatinib. Jest także silnym (IC_{50} rzędu 0,5 nM) inhibitorem kinaz LCK, FYN, SRC i HCK. Co więcej, tyrfostin ten hamuje także aktywność c-Kit ($IC_{50} = 5$ nM) i PDGFRb ($IC_{50} = 28$ nM). BMS-354825 hamował całkowicie wzrost wybranych linii komórek transformowanych w zakresie IC_{50} 0,1–1 mM. Testy kliniczne wskazują, że dasatinib hamuje kinazę ABL i ma zdolność hamowania wzrostu nowotworów opornych na imatinib [57]. To zapewne (obok dobrej tolerancji przez organizm) zadecydowało o dopuszczeniu w ubiegłym roku tego tyrfostinu do leczenia nowotworów w Stanach Zjednoczonych. Porównanie

TABELA 3. Porównanie aktywności inhibitorów kinazy BCR-ABL (wartości IC₅₀) w przeliczeniu na aktywność imatinibu (IC₅₀ = 1) [obliczone z danych [57]]

Mutacja	AMN107	BMS-354825	ON012380
p210 (wt)	0,075	0,004	0,092
L248R	≤ 0,046*	≤ 0,001*	n.t.
Y253H	0,042*	≤ 0,001*	≤ 0,001*
E255K	≤ 0,09	0,001	≤ 0,001
T315I	1*	0,1*	≤ 0,001*
F317L	0,051	0,022	n.d.

* – dane orientacyjne ze względu na bardzo niską aktywność imatinibu (STI-571),
n.d. – nie oznaczono

aktywności czterech tyrfostinów (STI-571, AMN107, ON012380 i BMS-354825) przedstawiono w tabeli 3.

Inhibitory kinaz tyrozynowych pośredniczących w angiogenezie

Tworzenie nowych naczyń krwionośnych jest poważnym problemem w licznych chorobach, takich jak: reumatoidalne zapalenie stawów, łuszczyca i nowotwory. Uważa się powszechnie, że wzrost guzów nowotworowych o wymiarach większych od 1–2 mm wymaga uformowania nowych naczyń. Zahamowanie angiogenezy jest jednym z celów terapii przeciwnowotworowej, ograniczającym wzrost i przeżycie nowotworów. Regulacja procesu angiogenezy jest skomplikowana i wielostopniowa. Uczestniczy w niej wiele czynników, między innymi czynniki wzrostowe. Ważną rolę odgrywają VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) i angiopoetyny, a zwłaszcza ich współdziałanie [46,49]. Dlatego poszukuje się także metod blokowania aktywności ich receptorów, głównie VEGFR2 i Tie-2. Zsyntetyzowano wiele drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz tyrozynowych receptorów VEGF (m.in. SU5416, ZD6474, SU11248), ale żaden z nich nie znalazł zastosowania praktycznego. Natomiast, multien-zymatyczny inhibitor VEGFR - BAY 43-9006 jest stosowany w leczeniu wybranych chorób nowotworowych. Okazało się, że związek ten hamuje także aktywność VEGFR2, VEGFR3, FLT-3, PDGFR, p38 i c-Kit [53,60]. Odkryty początkowo jako inhibitor c-Raf i B-Raf i z tego względu stosowany w leczeniu metastatycznych czerniaków (częste mutacje aktywujące B-Raf). Jego skuteczność w leczeniu czerniaków okazała się jednak niewystarczająca i dzisiaj jest stosowany głównie w zwalczaniu nowotworów nerek [43,55].

Pierwszym, dobrze scharakteryzowanym inhibitorem Tie-2 był kwas triterpeno-karboksylowy wyizolowany z akacji (*Acacia aulacocarpa*) o stosunkowo niskiej aktywności biologicznej. Syntetyczne inhibitory, takie jak heterocykliczne pochodne aminotiazoli (IC₅₀ ≈ 5 μM), pochodne idolu (IC₅₀ = 3 μM) czy pirymidyny (IC₅₀ = 4 nM) były już bardziej efektywne [20,37], aczkolwiek ich użycie w terapii przeciwnowotworowej jest nadal kwestią przyszłości. Najbardziej prawdopodobne wydaje się,

TABELA 4. Tyrfostiny dopuszczone przez amerykańską FDA (*Food and Drug Administration*) do użytku klinicznego

Tyrfostin	Typ nowotworu	Dopuszczenie	Tolerowana dzienna dawka*[mg]
Imatinib (STI571)	CMLGIST	05.2001 02.2002	700 2 x 400
Gefitinib ZD1839)	NSCLC	05.2003	700
Erlotinib (OSI 774)	NSCLC	11.2004	150
Sorafenib (Bay 43-9006)	mRCC	12.2005	2 x 400
Sunitinib SU11248)	mRCC/GIST	01.2006	50
Dasatinib BMS-354825)	CML	05.2006	180

*zazwyczaj lek podawano przez okres 4–6 tygodni, po czym następowała 2-tygodniowa przerwa; CML – chroniczna białaczka szpikowa, NSCLC – niedrobnokomórkowy rak płuc, mRC – metastatyczny rak nerek, GIST – stromalny nowotwór przewodu pokarmowego

że zastosowanie kombinacji inhibitorów dla receptorów VEGF i Tie-2 wydajnie stymulując proces apoptozy komórek endotelialnych [37]. Użycie mieszanin inhibitorów może potęgować efekt pojedynczych tyrfostinów.

Mimo że nie uzyskano dotychczas jednoznacznie pozytywnych wyników klinicznego stosowania tyrfostinów, nadal trwają próby syntezy nowych, bardziej skutecznych leków z tej grupy związków. Wiele z nich jest obecnie w różnej fazie testów klinicznych w przypadku różnych chorób proliferacyjnych, a niektóre z nich [30] zostały zatwierdzone przez amerykańską FDA (*Food and Drug Administration*) jako leki przeciwnowotworowe (tab. 4)

III. UWAGI KOŃCOWE

Corocznie syntetyzowane są setki potencjalnych inhibitorów kinaz białkowych zarówno tyrozynowych, jak i serynowo/treoninowych w nadziei, że nowe związki będą bardziej aktywne, bardziej selektywne i lepiej tolerowane przez organizm ludzki. Sukces tych leków w leczeniu określonych populacji pacjentów był przyczyną entuzjastycznego podejścia do badań, których celem była regulacja aktywności kinaz białkowych. Szacuje się obecnie, że jedna trzecia programów ukierunkowanych na poszukiwanie nowych leków przeciwnowotworowych jest związana bezpośrednio (lub pośrednio) z kinazami białkowymi. Aczkolwiek, wiele inhibitorów kinaz białkowych zawodzi nadzieje ich odkrywców w badaniach przedklinicznych i klinicznych. Główną przyczyną jest mała selektywność działania i związane z tym efekty uboczne, a to wynika z konserwatywnej budowy domeny katalitycznej tych enzymów zarówno pod względem sekwencji aminokwasowej, jak i struktury przestrzennej.

Czy rzeczywiście tyrfostiny będą alternatywą w leczeniu, nawet wybranych chorób nowotworowych? Odpowiedź na to pytanie jest trudna. Za ich stosowaniem przemawia

przede wszystkim to, że są znacznie lepiej tolerowane przez organizm niż klasyczne cytostatyki, są skuteczne w przypadku nowotworów, w których klasyczne cytostatyki zawodzą oraz że mogą być podawane doustnie, co zmniejsza uciążliwość terapii przeciwnowotworowej. Przeciw świadczą wyniki dotychczasowych, długoterminowych prób klinicznych. Po pierwsze żaden z tyrfostinów stosowanych samodzielnie nie doprowadził do całkowitej regresji nowotworu, a po drugie wraz z przedłużaniem terapii wzrastało prawdopodobieństwo nowych mutacji i amplifikacji genów promitogennych. Większość badaczy skłania się ku koncepcji, że najlepsze perspektywy stwarza użycie mieszanin: a) tyrfostinów o różnym mechanizmie inhibicji, np. STI571 (współzawodniczący z ATP) i N012380 (współzawodniczący z substratem), b) tyrfostinów i przeciwciał skierowanych przeciwko tej samej kinazie, np. Gefitinib i anty-EGFR (mAB2245), c) tyrfostinów i klasycznych cytostatyków.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BARKER AJ, GIBSON KH, GRUNDY W, GODFREY SA, BARLOW JJ. Studies leading to the identification of ZD1839 (Iressa): an orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor target to the treatment of cancer. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; **11**: 1911–1914.
- [2] BELLEZZA H, BRACARDA S, CASERTA C, MINELLI A. Targeting of EGFR tyrosine kinase by ZD1839 („Iressa“) in androgen-responsive prostate cancer *in vitro*. *Mol Genet Metabol* 2006; **88**: 114–122.
- [3] BENNASROUNE A, GARDIN A, AUNIS D, CREMEL G, HUBERT P. Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; **50**: 23–38.
- [4] BENTLEY SD, CHTER KE, CERDENO-TARRAGA AM, CHALLIS GL, THOMSON NR, JAMES KD, HARRIS DE, QUAIL MA, KIESER H, HARPER D, BATEMAN A, BROWN S, CHANDRA G, CHEN CW, COLLINS M, CRONIN A, FRASER A, GOBLE A, HIDALGO J, HORNSBY T, HOWARTH S, HUANG C-H, KIESER T, LARKE L, MURPHY L, OLIVER K, O'NEIL S, RABBINOWITSCH E, RAJANDREAM M-A, RUTHEFORRD K, RUTTER S, SEEGER K, SAUNDERS D, SHARP S, SQUARES R, SQUARES S, TAYLOR K, WARREN T, WIETZORREK A, WOODWARD J, BARRELL BG, PARKHILL J, HOPWOOD DA. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A39(2). *Nature* 2002; **417**: 141–147.
- [5] BEREZOV A, CHEN J, LIU Q, ZHANG HT, GREENE MI, MURALI R. Disabling receptor ensembles with rationally designed interface peptidomimetics. *J Biol Chem* 2002; **277**: 28330–28339.
- [6] CETKOVIC H, GREBENJUK VA, MULLER WEG, GAMULIN V. Src proteins/src genes: from sponges to mammals. *Gene* 2004; **342**: 251–261.
- [7] CHONG Y-P, IA KK, MULHERN TD, CHENG H-C. Endogenous and synthetic inhibitors of the Src-family protein tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1754**: 210–220.
- [8] CHOONG NW, COHEN EEW. Epidermal growth factor receptor directed therapy in head and neck cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; **57**: 25–43.
- [9] COCHRAN AG. Antagonists of protein-protein interactions. *Chem Biol* 2000; **7**: R85–R94.
- [10] COHEN P. Protein kinases, the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discovery* 2002; **1**: 309–315.
- [11] CUSSAC D, VIDAL M, LEPRINCE C. A Sos-derived peptidimer blocks the Ras signaling pathway by binding both Grb2 SH3 domains and displays antiproliferative activity. *FASEB J* 1999; **13**: 31–38.
- [12] CZECHOWSKA A, BŁASIAK J. Inhibitor kinaz tyrozynowych STI571 – nadzieja na przełom w leczeniu białaczek? *Post Biochem* 2003; **49**: 157–167.
- [13] DeMATTEO RP, MAKI RG, ANTONESCU C, BRENNAN MF. Targeted molecular therapy for cancer: The application of STI571 to gastrointestinal stromal tumor. *Curr Problems Surgery* 2003; **40**: 135–141.

- [14] GADZICKI D, von NEUHOFF N, STEINEMANN D, JUST M, BUCHE G, KREIPE H, WILKENS L, SCHLEGELBERGER D. BCR-ABL gene amplification and overexpression in a patient with chronic myeloid treated with imatinib. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; **159**: 164–167.
- [15] GARBAY C, LIU WQ, VIDAL M, ROQUES BP. Inhibitors of Ras signal transduction as antitumor agents. *Biochem Pharmacol* 2000; **60**: 1165–1169.
- [16] GARCIA-ECHEVERRIA C, PEARSON MA, MARTI A, MEYER J, ZIMMERMANN J, GAO J, BRUEGGEN J, CAPRARO H-G, COZENS R, EVANS DB, FABBRO D, FURET P, PORTA DG, LIEBATANZ J, MARTINY-BARON G, RUETZ S, HOFMANN F. *In vivo* antitumor activity of NVP-AEW541 – A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer Cell* 2004; **5**: 231–239.
- [17] GENNIGENS C, MENETRIER-CAUX C, DROZ JP. Insuline-like growth factor (IGF) family and prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; **58**: 124–145.
- [18] GIRNITA A, GIRNITA L, DEL PRETE F, BARTOLAZZI A, LARSSON O, AXELSON M. Cyclolignans as inhibitors of the insulin-like growth factor-1 receptor and malignant cell growth. *Cancer Res* 2004; **64**: 236–242.
- [19] HENSON ES, GIBSON SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implication for cancer therapy. *Cellular Signaling* 2006; **18**: 2089–2097.
- [20] HODOUS BL, GEUNS-MEYER SD, HUGES PE, ALBRECHT BK, BELLON S, BREADY J, CAENEPEEL S, CHAFFEE SC, COXON A, EMERY M, FRETLAND J, GALLANT P, GU Y, HOFFMAN D, JOHNSON RE, KIM JL, LONG AM, MORRISON M, OLIVIERI PR, PATEL VF, POLVERINO A, ROSE P, TEMPO...P, WHITTINGTON DA, ZHAO H. Evolution of highly selective and potent 2-(pyridin-2-yl)-1,3,5-triazine Tie-2 kinase inhibitor. *J Med Chem* 2007; **50**: 611–626.
- [21] HUBBARD SR, TILL JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Ann Rev Biochem* 2000; **69**: 373–398.
- [22] JIMENO A, HIDALGO M. Blockade of epidermal growth factor receptor (EGFR) activity. *Critical Rev Oncol Hematol* 2005; **53**: 179–192.
- [23] KLEIN A. Peptydy regulujące wzrost komórkowy. W: Czynniki wzrostowe i cytokiny. A. Dubin (red.), Ser. wyd. Wyd. Biotechnologii UJ, 2006: 1–137.
- [24] KOZŁOWSKI W, SZACIKOWSKA E. Wielokierunkowe działanie Herceptyny w komórkach raka z nadekspresją receptora HER2 (białka p185). *Współczesna Onkologia* 2001; **5**: 254–259.
- [25] LACAL JC. Changing the course of oncogenesis: The development of tyrosine kinase inhibitors. *EJC Suppl* 2006; **4**: 14–20.
- [26] LEVITZKI A. Protein kinase inhibitors as novel therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 1999; **82**: 231–239.
- [27] LEVITZKI A. EGF receptor as a therapeutic target. *Lung Cancer* 2003; **41**: 9–14.
- [28] LEVITZKI A, MISHANI E. Tyrphostins and other tyrosine kinase inhibitors. *Ann Rev Biochem* 2006; **75**: 93–109.
- [29] LI M, WANG H, HILL DL, STINSON S, VELEY K, GROSSI I, PEGGINS S, COVEY JM, ZHANG R. Preclinical pharmacology of the novel antitumor agent adaphostin, a tyrphostin analog that inhibits bcr/abl. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; **57**: 607–614.
- [30] LIAO JJ-L. Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors. *J Med Chem* 2007; **50**: 409–424.
- [31] MAJSTEREK I, BŁASIAK J. Chromosom Filadelfia. *Post Biochem* 2002; **48**: 156–166.
- [32] MAJSTEREK I, PYTEL D, BŁASIAK J. Kinazy tyrozynowe. Nowy cel terapii przeciwnowotworowej. *Post Biochem* 2005; **51**: 251–260.
- [33] MANLEY PW, COWAN-JACOB SW, MESTAN J. Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukemia. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1754**: 3–13.
- [34] MANNING G, WHYTE DB, MARTINEZ R, HUNTER T, SUDARRSANAM S. The protein kinase complement of the human genom. *Science* 2002(a); **298**: 1912–1916.
- [35] MANNING G, WHYTE DB, MARTINEZ R, HUNTER T, SUDARRSANAM S. The protein kinase complement of the human genom. *Science* 2002(b); **298**: 1933–1934.
- [36] MATAR P, ROJO F, CASSIA R, MORENO-BUENO G, COSIMO S, TABERNERO J, GUZMAN M, RODRIGUEZ S, ARRIBAS J, PALACIOS J, BASELGA J. Combined epidermal growth factor receptor targeting with the tyrosine kinase inhibitor Gefatinib (ZD1839) and the monoclonal antibody Cetuximab (IMC-C225): superiority over single-agent receptor targeting. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 6487–6501.
- [37] MAZITSCHKE R, GIANNIS A. Inhibitors of angiogenesis and cancer-related receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Chem Biol* 2004; **8**: 432–441.

- [38] MEINBACH DS, LOKESHWAR BL. Insulin-like growth factor and their binding proteins in prostate cancer: cause or consequence? *Urolog Oncol* 2006; **24**: 294–306.
- [39] MISRA RN, XIAO H, KIM KS, LU S, HAN W-C, BARBOSA SA, HUNT JT, RAWLINS DB, SHAN W, AHMED SZ, QIAN L, CHEN B-C, ZHAO R, BEDNARZ MS, KELLAR KA, MULHERON JG, ROONGTA RU, KAMATH A, MARATHE P, RANADIVE SA, SACK JS, TOKARSKI JS, PAVLETICH NP, LEE FYF, WEBSTER KR, KIMBALL SD. 1. N-(cycloalkylamino)acyl-2-aminothiazole inhibitors of cyclin-dependent kinase 2. N-[5-[[[5-(1,1-dimethylethyl)-2-oxazolyl]methyl]thio-2-thiazolyl]-4-piperidin-carboxamide (BMS-387032), a high efficacious and selective antitumor agent. *J Med Chem* 2004; **47**: 1719–1724.
- [40] MOW BM, CHANDRA J, SVINGEN PA, HALLGREN CG, WEISBERG E, KOTTKE TJ, NARAYANAN VL, LITZOW MR, GRIFFIN JD, SAUSVILLE EA, TEFFERI A, KAUFMAN H. Effects of the bcr/abl kinase inhibitors STI571 and adaphostin (NSC680410) on chronic myelogenous leukemia cells *in vitro*. *Blood* 2002; **99**: 664–671.
- [41] NOBLE ME, ENDICOTT JA, JOHNSON LN. Protein kinases inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* 2004; **303**: 1800–1805.
- [42] PAEZ JG, JANNE PA, LEE JC, TRACY S, GREULICH H, GABRIEL S, HERMAN P, KAYE FJ, LINDEMANN N, BOGGON TJ, NAOIKI K, SASAKI H, FUJII Y, ECK MJ, SELLER WR, JOHNSON BE, MEYERSON M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to Gefitinib therapy. *Science* 2004; **304**: 1497–1500.
- [43] RATAIN MJ, EISEN T, STADLER WM, FLAHERTY KT, KAYE SB, ROSNER GL, GORE M, DESAI A, PATNAIK A, XIONG HQ, ROWINSKY E, ABBRUZZESE JL, XIA C, SIMANTOV R, SCHWARTZ B, O'DWYER. Phase II placebo-controlled randomized discontinuation trial of sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2006; **24**: 560–562.
- [44] ROBINSON DR, WU YM, LIN SF. The protein tyrosine kinase family of human genome. *Oncogene* 2000; **19**: 5548–5557.
- [45] ROSKOSKI R Jr. The ErbB/Her receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **319**: 1–11.
- [46] ROY H, BHARDWAJ S, YLA-HERTTUALA S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 2006; **580**: 2879–2887.
- [47] SCHLESSINGER J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 2002; **110**: 669–672.
- [48] SHAH NP, TRAN C, LEE FY, CHEN P, NORRIS D, SAWYERS CL. Overriding Imatinib resistance with a novel Abl kinase inhibitor. *Science* 2004; **305**: 399–401.
- [49] SHIBUYA M, CLAESSEON-WELSH L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006; **312**: 549–560.
- [50] SHIU SH, LI WH. Origins, lineage-specific expansions, and multiple losses of tyrosine kinases in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 2004; **21**: 828–840.
- [51] SMITH J. Erlotinib: Small-molecule target therapy in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Clin Therap* 2005; **27**: 1513–1534.
- [52] STROMBERG T, EKMAN S, GIRNITA L, DIMBERGLY, LARRSON P, AXELSON M, LENNARTSSON J, HELLMAN U, CARLSON K, OSTERBORG A, VANDERKERERKEN K, NILSSON K, JERNBERG-WIKLUND H. IGF-1 receptor tyrosine kinase inhibition by the cyclohexanone PPP induces G2/M-phase accumulation and apoptosis in multiple myeloma cells. *Blood* 2006; **107**: 669–678.
- [53] SUN L, LIANG C, SHIRAZARIAN S, ZHOU Y, MILLER T, CUI J, FUKUDA JY, CHU J-Y, NEMATALIA A, WAR...X, SISTLLU TC, TANG F, WEL J, TANG C. Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid(2-diethylamino ethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. *J Med Chem* 2003; **46**: 1116–1119.
- [54] TROJANEK J. Zwierzęce kinazy tyrozynowe. *Post Biochem* 2002; **48**: 66–73.
- [55] VAN SPRONSEN DJ, DE WEIJER KJM, MULDER PFA, DE MULDER PHM. Novel treatment strategies in clear-cell metastatic renal cell carcinoma. *Anticancer Drugs* 2005; **16**: 709–717.
- [56] WAKELING AE. Epidermal growth factor tyrosine kinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 2002; **2**: 382–387.
- [57] WALTZ CH, SATTLER M. Novel target therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; **57**: 145–164.

- [58] WARSHAMANA-GREENE GS, LITZ J, GRACIA-ECHEVARRIA C, HOFMANN F, KRYSTAL GW. The insulin-like growth factor I receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, sensitizes small cell lung cancer cell lines to the effects of chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 1563–1571.
- [59] WEINMANN H, METTERNICH R. Drug discovery process for kinase inhibitors. *Chem Bio Chem* 2005; **6**: 455–459.
- [60] WILHELM SM, CARTER C, TANG L, WILKIE D, MCNABOLA A. et al. BAY43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinase involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004; **64**: 7099–7109.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 30.04. 2007 r.

Przyjęto: 16.06. 2007 r.

30-387, Kraków, ul. Gronostajowa 7.

E-mail: klein@mol.uj.edu.pl